

Germination et fonctionnement du système photosynthétique des végétaux comme bioindicateurs de pollution des sols

P. Vernay, A. Austruy, C. Gauthier-Moussard, et A. Hitmi

Laboratoire de Physiologie et de Biotechnologies Végétales, IUT de Clermont-Ferrand, Université d'Auvergne, 100, rue de l'Égalité, 15000 Aurillac - France.

RÉSUMÉ

Les fonctions des sols sont amoindries par les pollutions directes ou indirectes dues aux activités anthropiques. Le développement de bioindicateurs est nécessaire afin d'évaluer de manière pertinente et globale les risques associés aux pollutions d'un écosystème. La germination des graines et le suivi du fonctionnement des systèmes photosynthétiques de plantes de quatre espèces végétales cultivées sur des sols témoins et pollués ont été suivis lors de cultures sous serre. La germination est inhibée par la présence de polluants dans les sols soit au niveau de la capacité germinative qui peut être divisée par 3 soit de la vitesse de germination des graines qui peut être diminuée d'un facteur 2. Des mesures de photosynthèse nette et des paramètres de fluorescence de la chlorophylle a sont effectuées sur des plantes appartenant à des espèces au comportement tolérant, indicateur ou « exclure » (limitant l'absorption) vis-à-vis des éléments traces métalliques, cultivées pendant 2 mois sur des sols pollués. Le fonctionnement des systèmes photosynthétiques, et notamment des photosystèmes II, est systématiquement inhibé chez les espèces utilisées. Cette étude valide la proposition d'utiliser la germination des graines et le processus de photosynthèse comme bioindicateurs de la qualité des sols. Des expérimentations supplémentaires effectuées in natura doivent permettre de calibrer ces paramètres.

Mots clés

Bioindicateur, sol pollué, fluorescence chlorophyllienne, photosynthèse, germination.

SUMMARY

SEED GERMINATION AND PHOTOSYNTHESIS OF PLANTS AS BIOINDICATORS OF SOIL POLLUTION

Because of its direct impact on health, water pollution, biodiversity, agriculture and reusability of land, soil pollution has become a global matter of concern. Bio-monitoring of a polluted site through the performance of living plants provides an overall picture of the resulting environmental impact. It's sensibility to long term exposure, and cumulative effects overcome some of the shortcomings associated with the direct measurements of physicochemical variables. The germination ability of selected seeds and the photosynthetic apparatus activity of plants were explored as potential bioindicators of soil pollution. Four different plants were studied: two Poaceae (*Lolium perenne* and *Zea mays*) of significant agricultural importance, a tolerant Solanaceae (*Datura innoxia*), and an excluder Caryophyllaceae (*Silene vulgaris*). These species were seeded onto four different substrates: compost, used as a control for germination and plant physiology, a soil originating from a pasture land, free of pollution, and 2 polluted soils "63" and "42". Soil "63" is a surface polluted site from metallurgical foundry wastes while "42" is an anthroposol constituted on top of a metallurgical waste dump (Table I). These soils exhibit polymetallic pollutions mainly from lead and chromium for "42" and nickel and chromium for "63". The germination rates after 10 days and the half-germination time (5 mm radicle emergence) were determined. The half-germination time showed a significant difference between control and polluted soils for all the plants and apart from *S. vulgaris* all germination rates are lowered on polluted soils (Table II & III). After 2 months of growth on the different soils, the biomasses of the four plants were followed. Plants cultivated onto soils "63" and "42" showed a significant inhibition of growth. This was more important for *D. innoxia* while *L. perenne* exhibited the lowest decrease with an average of 23 % of biomass lost on polluted soils (Figure 1). Before harvest, the net photosynthesis and the chlorophyll a fluorescence (F_o and F_v/F_o) of the plants were measured (Figure 2). Under adverse conditions, damage to PSII is often the first manifestation of stress in a leaf. These non destructive measures are very robust and have volumes of supporting research regarding their value and sensitivity in plant stress measurement. For all the plant species used in this study, the net photosynthesis and chlorophyll a fluorescence were modified in a similar way. While they are no differences between the control substrates used, a significant increase in F_o which range from 15 % to 35 % and a decrease in F_v/F_o and net photosynthesis were observed for the four species studied.

Key-words

Bioindicators, soil pollution, chlorophyll a fluorescence, net photosynthesis, germination.

RESUMEN

GERMINACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA FOTOSINTÉTICO DE LOS VEGETALES COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN DE LOS SUELOS

Las funciones de los suelos están reducidas por las contaminaciones directas o indirectas debidas a las actividades antrópicas. El desarrollo de bioindicadores está necesario para evaluar de manera pertinente y global los riesgos asociados a las contaminaciones de un ecosistema. Se siguieron la germinación de semillas y el seguimiento de los sistemas fotosintéticos de plantas de cuatro especies vegetales cultivadas sobre suelos testigos y contaminados durante cultivos en invernadero. La germinación esta inhibida por la presencia de contaminantes en los suelos sea al nivel de la capacidad germinativa que puede estar dividida por 3 sea de la velocidad de germinación de las semillas que puede estar disminuida por un factor 2. Se efectuaron medidas de fotosíntesis neta y de los parámetros de fluorescencia de la clorofila a sobre plantas que pertenecen a especies con comportamiento tolerante, indicador o "excluder" (limitante del absorción) frente a los elementos en trazas metálicos cultivadas durante 2 meses sobre suelos contaminados. El funcionamiento de los sistemas fotosintéticos, y en particular de los fotosistemas II, está sistemáticamente inhibido en las especies usadas. Este estudio valida la propuesta de usar la germinación de semillas y el proceso de fotosíntesis como bioindicadores de la calidad de los suelos. Experimentaciones suplementarias efectuadas in natura deben permitir calibrar estos parámetros.

Palabras clave

Bioindicadores, fluorescencia clorofílica, fotosíntesis, germinación.

Depuis une cinquantaine d'années, les phénomènes de pollution ont pris une importance grandissante dans les domaines sanitaires, économiques et politiques. Face à ce constat, il est apparu nécessaire de se doter de moyens permettant caractériser et de suivre l'impact de ces pollutions. Des méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier les contaminants majeurs de nature organique et métallique ont été développées et utilisées dans des programmes de diagnostic et de surveillance des sols. Cependant, ces méthodes ne permettent pas d'évaluer les effets des contaminants sur les organismes vivants. Il a été établi que l'écotoxicité des polluants est principalement fonction de leur fraction biodisponible et non de leur concentration totale. Elle dépend également de phénomènes de synergie ou d'antagonisme entre polluants qui sont particulièrement complexes à modéliser.

Il est donc nécessaire de développer des outils capables d'évaluer de manière globale et intégrée la qualité des sols. Dans ce contexte, il est évident que l'observation et l'étude des organismes vivants dans les milieux contaminés constituent l'approche la plus pertinente pour évaluer l'impact biologique des polluants potentiellement présents (Fletcher, 1991). L'utilisation d'indicateurs biologiques est en fait une démarche couramment adoptée dans les procédures de surveillance de la qualité des eaux et de l'air (Afnor 2008; Afnor 2007; Afnor 2003), mais pour les sols, aucune méthode rapide, simple, de faible coût et utilisable en routine n'est encore validée.

Dans ce domaine, les végétaux pourraient représenter d'excellents modèles pour analyser les symptômes de toxicité lors d'expositions à des polluants. En particulier, l'action d'un stress sur le métabolisme du végétal peut être décelée de manière précoce par son effet sur la germination des graines ou sur le fonctionnement des systèmes photosynthétiques. Ces perturbations physiologiques peuvent donc constituer des biomarqueurs d'exposition qui pourraient être intégrés aux procédures d'évaluation de la qualité d'un sol.

La germination est l'ensemble des événements qui commencent par l'étape cruciale d'absorption de l'eau par la graine et se termine par l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule. La capacité germinative des semences des plantes est le premier processus physiologique affecté par la présence des métaux lourds dans les sols (Mihoub *et al.*, 2005). De ce fait la germination des graines a été proposée parmi les batteries de biotests utilisées pour suivre l'écotoxicité de la contamination des sols par des polluants d'origine anthropique (Gong *et al.*, 2001). L'inhibition de ce processus semble toutefois dépendre de la nature et de la concentration de la contamination, de l'espèce végétale, voire même de la variété (Carlson *et al.*, 1991).

La photosynthèse est le processus par lequel les végétaux chlorophylliens, en présence de lumière, fixent le CO₂ atmosphérique pour produire de la matière organique. Il est aujourd'hui bien établi que les capacités photosynthétiques des

plantes peuvent être affectées par divers facteurs de stress et notamment par la présence d'éléments traces métalliques (ETM) (Mysliwa-Kurdziel *et al.*, 2002). Ces perturbations se manifestent, entre autres, par une augmentation de la fluorescence de la chlorophylle *a* associée à une baisse de la photosynthèse nette. Des mesures du fonctionnement du système photosynthétique et de la fluorescence de la chlorophylle *a* pourraient donc mettre en évidence des conditions de stress et constituer ainsi des biomarqueurs de pollution d'un sol (Barócsi *et al.*, 2000).

La présente étude a pour objectif de déterminer si le processus de germination des graines et le fonctionnement des systèmes photosynthétiques de plusieurs espèces végétales mises en culture sur des sols comportant des pollutions de différentes natures pourraient être retenus comme bioindicateurs de la qualité des sols.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Matériel végétal

Quatre espèces végétales ont été retenues pour cette étude en fonction de leur réponse aux polluants métalliques :

- *Datura innoxia* Mill. appartient à la famille des Solanacées. Cette espèce rudérale, productrice d'alkaloïdes tropaniques (hyoscyamine et scopolamine), a été caractérisée au laboratoire comme tolérante au zinc (Vaillant *et al.*, 2005) et comme bioindicatrice d'un excès en nickel. Salt *et al.* (1995) ont montré qu'elle était tolérante au Cd et présente sur des sols miniers et des friches industrielles.

- *Lolium perenne* L. est une Poacée utilisée comme plante fourragère. Elle présente une importante biomasse et est qualifiée de métalophyte facultative. *Lolium perenne* est considérée par l'OCDE comme espèce modèle dans l'étude de la toxicité des molécules et de la qualité de l'environnement (Arienzo *et al.*, 2004).

- *Zea mays* L. est une Poacée à intérêt agronomique. Elle est cultivée dans des conditions environnementales variées (de 0 à 3 000 m d'altitude). Cette espèce est considérée comme tolérante aux pollutions polymétalliques et organiques des sols (Lin *et al.*, 2008).

- *Silene vulgaris* (Moench) Garcke est une Caryophyllacée ayant un comportement d'« exclure » vis-à-vis des éléments métalliques (Wenzel *et al.*, 2003). C'est une espèce des friches, vivace, rudérale et pionnière. Cette espèce est présentée comme tolérante au Cd, Zn, Pb, As et Cu et est fréquemment observée sur des crassiers (Bratteler *et al.*, 2006).

Les graines de *Datura innoxia*, *Lolium perenne*, *Zea mays* et *Silene vulgaris* ont été obtenues respectivement du Jardin Botanique de Bordeaux, de l'INRA de Versailles, de l'INRA de Clermont-Ferrand et du Jardin Botanique de Montpellier.

Supports de culture

Au cours de ce travail, deux sols « pollués » ont été étudiés :

- Le site « 63 » est le site d'une entreprise métallurgique en activité située dans le département du Puy-de-Dôme. Elle produit et transforme des aciers spéciaux, superalliages, alliages d'aluminium et alliages de titane. La zone de prélèvement choisie correspond à un ancien dépôt de battitures métalliques sèches issues de la forge et des laminoirs, déposées à même le sol. Les battitures ont été éliminées et la zone reste utilisée pour le stockage temporaire de matériel. Le prélèvement a été réalisé en novembre 2003, la couche superficielle du sol contenant quelques résidus métalliques et la litière végétale ont été enlevées avant prélèvement du sol sur une profondeur de 5 à 20 cm. Les caractéristiques chimiques et les teneurs en éléments métalliques de ce sol (Jean *et al.*, 2008) sont présentées dans le *tableau 1*.

- Le site « 42 » correspond à un ancien crassier métallurgique situé dans le département de la Loire. Il a été utilisé de 1916 à 1950 comme site de stockage de résidus métalliques de fonderie par une entreprise métallurgique proche. Il ne s'agit donc pas d'un sol formé par dégradation de la roche mère mais d'un anthroposol formé progressivement à la surface des déchets de fonderie. La couche superficielle du sol a été éliminée et la tranche 5-10 cm a été prélevée. Les caractéristiques chimiques et les teneurs en éléments métalliques de ce sol (Remon *et al.*, 2005) sont présentées dans le *tableau 1*.

Par ailleurs, deux sols témoins, exempts de toute pollution par des ETM, ont été utilisés. L'un provient de la commune de Saint-Paul, près de Limoges, en Haute-Vienne. Le site de prélèvement se trouve sur une zone de pâturage éloignée de toute route et de toute activité industrielle. Il n'a subi aucun apport d'origine agricole ou industriel dans le passé. Après élimination de la partie superficielle, la tranche 5-10 cm a été prélevée. Le second

sol témoin utilisé est un terreau universel (Villmorin NF U 44-551). Il est composé de tourbes blonde et brune, d'écorce compostée, de fumier et de 1,7 kg/m³ d'engrais NPK 14-14-14 (*tableau 1*).

Paramètres mesurés

Tests de germination

Le pouvoir germinatif des graines est évalué à l'aide d'un test de germination inspiré des normes internationales en vigueur (International Seed Testing Association (ISTA), 1999). Il s'agit d'évaluer l'inhibition de la germination des semences mises en contact avec des sols pollués à tester.

Lors de chaque test, 25 graines de chaque espèce sont mises à germer sur 200 g de chaque type de sol. Chaque condition (couple espèce/sol) est répétée 5 fois. Les répétitions sont réparties dans 4 bacs de germination différents. Le nombre de graines germées est enregistré toutes les six heures pendant la durée de l'expérimentation. La durée du test est de 10 jours. Les données mesurées sont la capacité germinative et la vitesse de germination. La capacité germinative correspond au nombre total de graines ayant germé pendant la durée du test ramené au nombre de graines mises en germination. La vitesse de germination est exprimée par la durée moyenne de germination. Il correspond au temps nécessaire à la germination de 50 % des graines (T50). Ce dernier paramètre est exprimé en heure.

Une graine est considérée comme germée lorsque la racine mesure au moins 5 mm de longueur.

Mises en culture et mesures de la croissance des plantes

Les plantes issues de la germination de graines sur sols pollués sont transférées sur le même type de sols. Après tamisage ($\sigma = 2$ mm), 800 g de chacun des sols sont placés dans des sacs

Tableau 1 : Caractéristiques chimiques et teneurs en éléments traces métalliques des sols étudiés (d'après Jean *et al.*, 2008 et Remon *et al.*, 2005).

Table 1 : Main chemical properties and total element content of the control and contaminated soil (from Jean *et al.*, 2008; Remon *et al.*, 2005).

Paramètres chimiques	Terreau	Sol prairie	Sol « 63 »	Sol « 42 »
pH	6,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1	6,3 ± 0,1	7,9 ± 0,1
CEC (meq/100 g)	7,9 ± 0,5	6,7 ± 0,2	2,3 ± 0,1	14,2 ± 2,1
C organique (g.kg ⁻¹)	35,1 ± 1,7	9,0 ± 0,7	29,0 ± 0,8	8,43 ± 0,75
Zn (mg.kg ⁻¹ de sol)	50,1 ± 3,2	69 ± 5	138 ± 3	358 ± 119
Cu (mg.kg ⁻¹ de sol)	17,1 ± 0,3	17 ± 4	29 ± 2	199 ± 37
Pb (mg.kg ⁻¹ de sol)	8,56 ± 1,65	3 ± 1	87 ± 2	1551 ± 2353
Co (mg.kg ⁻¹ de sol)	--	10 ± 3	40 ± 4	--
Cr (mg.kg ⁻¹ de sol)	9,84 ± 0,69	19 ± 1	113 ± 10	1406 ± 330
Ni (mg.kg ⁻¹ de sol)	4,47 ± 0,29	13 ± 1	280 ± 20	300 ± 37

imperméables, puis dans des pots. Cette disposition permet d'éviter toute perte liée à la lixiviation des éléments minéraux de chaque sol. Sur chacun de ces pots une plantule issue de la phase de germination est repiquée. Dans le cadre de cette étude, six répétitions sont réalisées. Un apport de 100 ml d'eau distillée est effectué tous les deux jours entre 9 heures et 11 heures du matin. Les pots sont placés en serre tempérée afin d'avoir des conditions de culture les plus proches possible de la réalité.

Après 2 mois de culture sous serre, les plantes sont récoltées. Les masses fraîches totales (MFT) des parties aériennes et souterraines de chaque plante sont déterminées par pesée. Une fraction (de l'ordre du gramme) des parties aériennes et racinaires est également prélevée, pesée (matière fraîche: MF) et séchée à 86 °C pendant au moins 72 heures puis à nouveau pesée (matière sèche: MS). La teneur en eau (TE) du matériel végétal, exprimée en pourcentage, est déterminée d'après la formule: $TE = [(MF - MS)/MS] \times 100$. Les masses sèches totales (MSt) sont alors calculées à partir de la teneur en eau selon l'équation suivante: $MSt = MFT \times (1 - TE)$.

Mesures des paramètres physiologiques

Avant la récolte, des mesures non destructives des paramètres qui caractérisent le fonctionnement des systèmes photosynthétiques sont effectuées. Les paramètres mesurés sont:

- *Photosynthèse nette (A)*: les mesures ont été réalisées à l'aide d'un appareil portable Li-Cor modèle 6400 (Lincoln, NE,

USA). L'appareil comporte une console contenant l'électronique et l'ensemble de régulation du flux d'air. La console est reliée à une pince qui vient enfermer la feuille dans une chambre étanche de 6 cm² (2 cm x 3 cm). L'hygrométrie de l'air est régulée à 30 % d'humidité relative par passage sur de la drierite. La teneur en CO₂ est ajustée à la valeur de 360 μmol CO₂.L⁻¹ par un injecteur à CO₂ (LI-6400-01, Lincoln, NE, USA) qui utilise comme source des cartouches sous haute pression de CO₂ liquéfié. Les concentrations en H₂O et en CO₂ à l'entrée et à la sortie de la chambre sont déterminées par deux spectrophotomètres à infrarouge placés directement dans la pince. La température de la chambre est fixée à 23 °C, elle est contrôlée par deux systèmes de refroidissement thermoélectriques (effet Peltier) et mesurée par un thermocouple placé sous la feuille. La feuille est éclairée par une source de lumière constituée du module LI-6400-02 LED (Lincoln, NE, USA). Elle reçoit 400 μmol.m⁻².s⁻¹, l'intensité lumineuse est mesurée par un capteur à diode de silicium placé directement dans la source.

Au cours d'une mesure, l'analyseur enregistre régulièrement le flux de la pompe et les variations des taux de CO₂ et d'H₂O dans le circuit.

- *Fluorescence de la chlorophylle a*: les paramètres mesurés permettent de déterminer le fonctionnement des PSII et notamment de l'antenne collectrice et de la transmission de l'énergie lumineuse en énergie potentielle électrochimique. Les paramètres mesurés sont obtenus sur des feuilles intactes à l'aide d'un système FMS 1 « Pulse Amplitude Modulation

Tableau 2: Capacité germinative des graines (%) de différentes espèces de plantes sur des sols contaminés par des activités anthropiques (Sol « 63 » et Sol « 42 ») et sur des sols témoins non contaminés (Terreau et Sol prairie), n = 5.

Table 2: Toxicity of control and polluted soils on seed germination (%) of plant species (n = 5).

Espèce végétale	Sols testés			
	Terreau	Sol prairie	Sol « 63 »	Sol « 42 »
<i>D. innoxia</i>	84,6±4,8	89,1±7,2	36,9±4,6	49,7±5,7
<i>L. perenne</i>	91,4±5,2	94,6±3,4	47,2±7,7	31,8±4,2
<i>Z. mays</i>	96,7±8,6	94,7±6,4	56,4±3,4	58,1±6,1
<i>S. vulgaris</i>	73,4±5,7	84,6±2,4	71,6±2,3	82,8±6,7

Tableau 3: vitesse de germination (h) des graines de différentes espèces de plantes sur des sols contaminés par des activités anthropiques (Sol « 63 » et Sol « 42 ») et sur des sols témoins non contaminés (Terreau et Sol prairie)

Table 3: Effect of control and polluted soils on the kinetics of seed germination of plant species (n = 5).

Espèce végétale	Sols testés			
	Terreau	Sol prairie	Sol « 63 »	Sol « 42 »
<i>D. innoxia</i>	67,2±6,3	74,4±5,8	104,9±8,3	114,2±5,7
<i>L. perenne</i>	72,5±5,2	63,4±7,3	74,8±3,4	91,3±6,1
<i>Z. mays</i>	58,1±3,1	61,2±3,9	66,7±8,4	83,4±4,9
<i>S. vulgaris</i>	53,6±4,9	60,4±6,1	91,3±4,5	79,4±8,2

Fluorescence Monitoring System 1 » (Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Ce système de mesure repose sur l'utilisation d'une lumière continue de très faible intensité, lumière actinique, et d'une lumière modulée, flash de lumière saturante. Différents paramètres sont suivis, nous présenterons les paramètres que nous proposons comme bioindicateurs potentiels de la qualité des sols. Ce sont la fluorescence minimale (F_0) et la primaire maximale des PSII (F_v/F_0).

Huit répétitions sont réalisées pour la mesure de la photosynthèse nette et des paramètres de la fluorescence de chlorophylle *a*.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Germination des graines

Les résultats concernant le comportement germinatif des graines des espèces étudiées en terme de capacité germinative et de durée médiane sous l'effet de la pollution des sols sont présentés dans les *tableaux 2 et 3*. Dans cette étude, l'analyse de la toxicité de pollutions polymétalliques sur la germination des semences révèle une différence significative dans la sensibilité des 4 espèces végétales. Le *tableau 2* montre qu'à l'exception de *Silene vulgaris*, les graines des 3 autres espèces ont une capacité germinative inhibée en présence des sols contaminés. Il est à noter que pour *Silene vulgaris*, si le premier paramètre n'est pas significativement affecté, la vitesse de germination des graines est significativement affaiblie (Tab. III). En effet, on note une augmentation du temps nécessaire pour la germination de 50 % des graines mises en culture de 48 % et de 70 % respectivement sur le sol « 63 » et « 42 ».

La germination des plantes est un processus complexe considéré comme fortement affecté par la présence d'un excès de métaux lourds. De plus, le pourcentage de germination peut être considéré comme reflétant la qualité de l'environnement des plantes. Les résultats obtenus avec les 4 espèces testées dans cette étude corroborent ceux obtenus par Catanese *et al.* (2006) et Martí *et al.* (2007). L'inhibition de la germination des graines sur sol pollué peut être due au pH extrême (cas du sol 42) et à la capacité des ETM à se lier aux groupements soufrés de certains acides aminés ce qui entraînerait une inhibition de l'activité des enzymes essentielles.

Bhatia *et al.* (2005) et Vogel-Mikuš *et al.* (2007) rapportent que les graines qui proviennent de plantes endémiques ou de plantes introduites dans des sites pollués par des métaux lourds ont une faible capacité germinative comparé aux graines de plantes témoin. Ceci pourrait expliquer la faible végétalisation d'un nombre élevé de ces sites.

La germination des graines des espèces considérées comme métalphytes par plusieurs auteurs a montré une variation dans les paramètres de germination. Cependant, les

2 paramètres présentent des évolutions différentes en fonction des espèces végétales. Des études complémentaires sur des graines récoltées sur des espèces endémiques aux sites pollués seront effectuées prochainement.

Croissance du matériel végétal

Pour chacune des quatre espèces, les plants cultivés sur les sols pollués « 63 » et « 42 » présentent une inhibition de croissance par rapport aux plants cultivés sur le Terreau et le sol prairie.

La mesure des masses de matières fraîches et le calcul des masses de matières sèches des parties aériennes et souterraines des plantes permettent de mettre en évidence les différences de production de biomasse sur les sols étudiés (*figure 1*).

Le retard de croissance de la partie caulinare le plus significatif est observé pour *Datura innoxia* (*figure 1*) sur les 2 sols pollués comparés aux sols témoins. *Lolium perenne*, en revanche, présente le retard le plus faible, avec une perte de 19 % de MS sur le sol « 63 » et de 26 % sur le sol « 42 ».

L'inhibition du développement des espèces est fonction des caractéristiques pédo-chimiques des sols. En effet, *Lolium perenne*, *Zea mays* et *Datura innoxia* présentent les mesures de masses sèches les plus réduites sur le sol « 42 », alors que pour *Silene vulgaris*, cela se produit sur le sol « 63 ». Le développement des plants de *Silene vulgaris* ne dépend donc pas uniquement de la teneur en éléments métalliques, mais également des autres caractéristiques pédo-chimiques du sol. Les résultats obtenus montrent que *Datura innoxia* est l'espèce la moins adaptée aux 2 sites pollués et peut donc être considérée comme espèce sensible aux conditions de culture alors que *Lolium perenne* est l'espèce la plus tolérante.

Photosynthèse nette et fluorescence chlorophyllienne

La photosynthèse est un processus complexe qui peut être affecté par différents facteurs environnementaux et notamment par la présence d'éléments traces métalliques (Prasad et Strzalka, 2002). Afin de mieux appréhender le fonctionnement du système photosynthétique en présence de pollutions polymétalliques, les quatre espèces végétales ont été cultivées sur des sols pollués, de la phase de germination jusqu'à 2 mois de développement. Les mesures de la photosynthèse nette et de la fluorescence chlorophyllienne ont été effectuées à ce stade phénologique. Les paramètres de fluorescence de la chlorophylle *a* (*figure 3*) et de photosynthèse nette (*figure 2*) ne présentent pas de valeurs significativement différentes entre le sol témoin et le terreau. Pour l'ensemble des plantes, le sol témoin correspond donc bien à un comportement physiologique optimal. Les résultats obtenus montrent que la capacité de fixation de CO_2 (*figure 2*) et les paramètres de fluorescence de la chlorophylle *a* (*figure 3*)

Figure 1: Biomasse aérienne et souterraine des quatre espèces étudiées (*Datura innoxia*, *Lolium perenne*, *Zea mays* et *Silene vulgaris*) cultivées sur des sols pollués par des activités anthropiques (Sol « 63 » et Sol « 42 ») et sur des sols témoins non contaminés (Terreau et Sol prairie), n = 6.

Figure 1: The effects of control and polluted soils on the growth of plants species (n = 6).

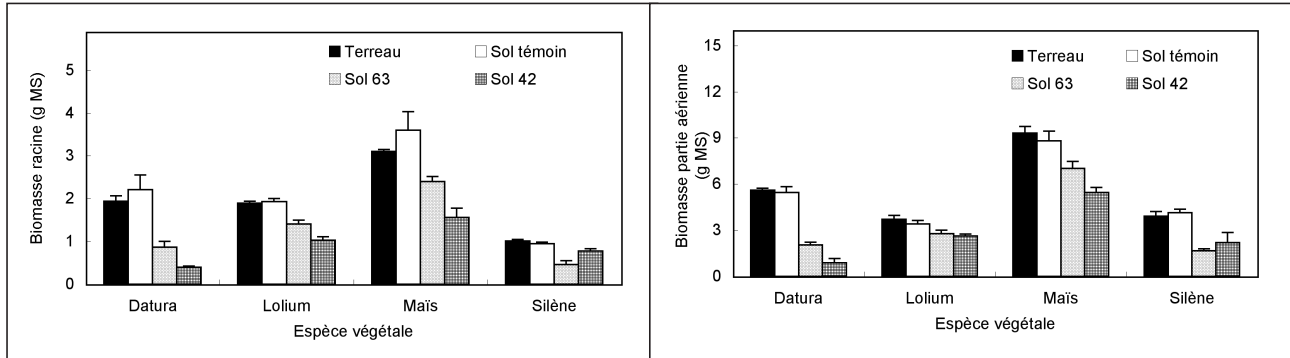


Figure 2: Photosynthèse nette (A) des quatre espèces étudiées (*Datura innoxia*, *Lolium perenne*, *Zea mays* et *Silene vulgaris*) cultivées sur des sols pollués par des activités anthropiques (Sol « 63 » et Sol « 42 ») et sur des sols témoins non contaminés (Terreau et Sol prairie), (n = 8).

Figure 2: The effects of control and polluted soils on the net photosynthesis (A) of plant species (n = 6).

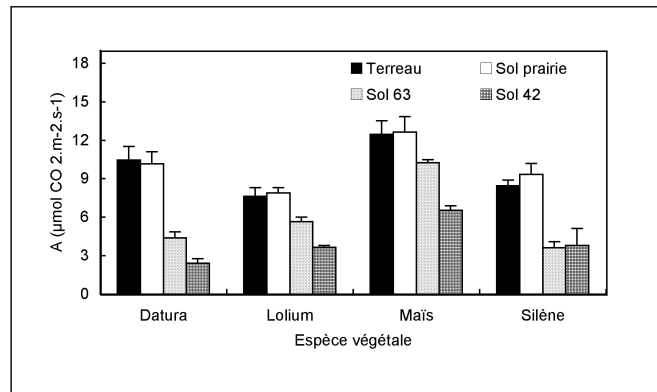
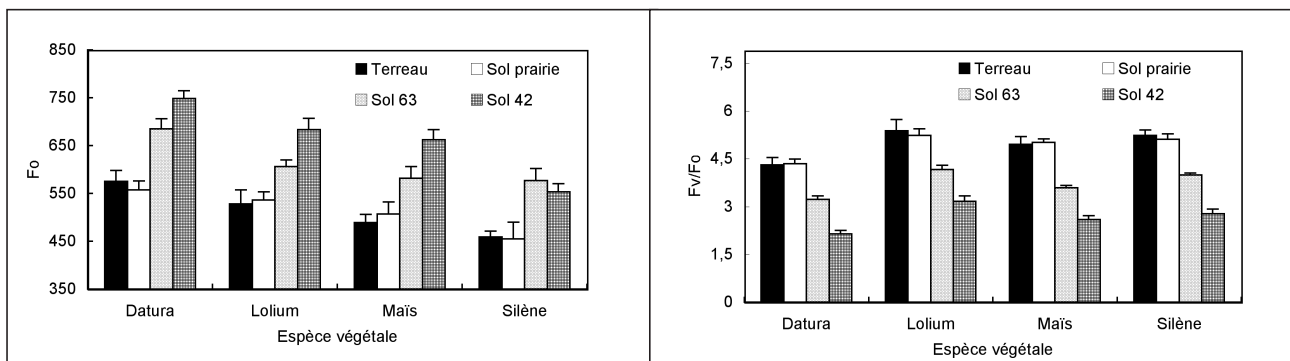


Figure 3: Paramètres de la fluorescence de la chlorophylle a des quatre espèces étudiées (*Datura innoxia*, *Lolium perenne*, *Zea mays* et *Silene vulgaris*) cultivées sur des sols pollués par des activités anthropiques (Sol « 63 » et Sol « 42 ») et sur des sols témoins non contaminés (Terreau et Sol prairie), n = 8.

Figure 3: The effects of control and polluted soils on the chlorophyll a parameters of plant species (n = 8).



sont modifiés de manière comparable quelle que soit l'espèce végétale étudiée. Ces perturbations se manifestent par une baisse de la photosynthèse nette associée à une augmentation de la fluorescence chlorophyllienne. Les plantes cultivées sur le sol « 42 » présentent une inhibition du fonctionnement photosynthétique plus marquée que celles cultivées sur le sol « 63 ». Ceci indique bien un niveau de contamination polymétallique plus important dans le sol « 42 » (tableau 1). On note également qu'il n'y a pas d'écart significatif entre les valeurs de photosynthèse nette (figure 2) et de fluorescence à l'obscurité F_0 (figure 3) mesurées sur *S. vulgaris* cultivée sur sol « 42 » et sol « 63 » alors que des écarts significatifs sont observés pour le paramètre F_v/F_0 (figure 3) dans les mêmes conditions. Ceci permet de conclure que ce dernier paramètre est l'indicateur le plus différenciant.

De nombreuses études ont rapporté des résultats similaires pour de multiples espèces végétales, pour des sols de caractéristiques géochimiques différentes et des pollutions de nature métallique et organique (Fränzle, 2006; Koblížek *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2001; Giardi *et al.*, 2001).

La mesure de l'activité du système photosynthétique est rapide, sensible et non destructive, et a été proposée comme une méthode de monitoring simple et efficace de l'environnement de la plante et de la qualité des sols (Gawronski et Gawronski, 2007; Baker *et al.*, 2004). Cette méthode est d'ailleurs proposée par l'entreprise SadeF (France) pour le suivi de l'état des plantes et dans la gestion des cultures pour identifier des stress hydriques ou une carence de minéraux dans les sols.

En se basant sur ces résultats et pour développer et valider des bioindicateurs faciles à mettre en place, reproductibles, non destructifs et rapides, des expérimentations seront réalisées *in natura* sur des espèces végétales indigènes à plusieurs sites pollués en France.

BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR, 2007 - NF T90-354 Détermination de l'Indice Biologique Diatomées.
- AFNOR, 2003 - NF T90-354 Détermination de l'indice biologique macrophytique en rivière.
- Arieno M., Adamo P., Cozzolino V., 2004 - The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *Sci Total Environ* 319, pp. 13-25.
- Baker N-R., Rosenqvist E., 2004 - Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55, pp. 1607-1621.
- Barócsi A., Kocsányi L., Várkonyi S., Richter P., Csintalan Z., Szente K., 2000 - Two-wavelength, multipurpose, truly portable chlorophyll fluorometer and its application in field monitoring of phytoremediation. *Meas Sci Technol* 11, pp. 717-729.
- Bhatia N-P., Nkang A-E., Walsh K-B., Baker A-J-M., Ashwath N., Midmore D-J., 2005 - Successful Seed Germination of the Nickel Hyperaccumulator *Stackhousia tryonii*. *Annals Bot* 96, pp. 159-163.
- Brattler M., Baltisberger M., Widmer A., 2006 - QTL Analysis of Intraspecific Differences between Two *Silene vulgaris* Ecotypes. *Ann Bot* 98, pp. 411-419.
- Carlson C-L., Adriano D-C., Sajwan K-S., Abels S-L., Thoma D-P., Driver J-T., 1991 - Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water Air Soil Pollut* 59, pp. 231-240.
- Catanese V., Siracusa V., Campiotti C-A., Saiano F., Alonzo, G., 2006 - Germination responses of *Opuntia ficusindica* (L.) Mill. on a heavy metal polluted substrate. *Geophys Res Abstr* 8, pp. 35-49.
- Fletcher J., 1991 - Keynote speech: a brief overview of plant toxicity testing. *In: Gorsuch J-W., Lower W-R., Wang W., Lewis M-A.* (Eds.), *Plants for Toxicity Assessment*. Eds. American Society for Testing and Materials STP 1115, Philadelphia, pp. 5-11.
- Fränzle O., 2006 - Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecolog Indic* 6, pp. 114-136.
- Gawronski S-W., Gawronski H., 2007 - Phytoremediation - Some case studies conducted at WAU. *In: Advanced Science and Technology for Biological Decontamination of Sites Affected by Chemical and Radiological Nuclear Agents*. Marmiroli N., Samotokin B., Marmiroli M. (Eds). Springer Netherlands. pp. 159-175.
- Giardi M-T., Koblížek M., Masojídek J., 2001 - Photosystem II-based biosensors for detection of pollutants. *Biosens Bioelectron* 16, pp. 1027-1033.
- Gong P., Wilke B-M., Strozzi E., Fleischmann S., 2001 - Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment soils. *Chemosphere* 44, pp. 491-500.
- International Seed Testing Association, 1999 - International Rules for Seed Testing: Rules 1999 : Adopted at the Twenty-fifth International Seed Testing Congress, South Africa 1998, to Become Effective in 1 July 1999. International Seed Testing Association, Zürich. p. 335.
- Jean L., Bordas F., Gautier-Moussard C., Vernay P., Hitmi A., Bollinger J-C., 2008 - Effect of citric acid and EDTA on chromium and nickel uptake and translocation by *Datura innoxia*. *Environ Poll* 153, pp. 555-563.
- Koblížek M., Malý J., Masojídek J., Komenda J., Kucera T., Giardi M-T., Mattoo A-K., Pilloton R., 2002 - A biosensor for the detection of triazine and phenylurea herbicides designed using Photosystem II coupled to a screen-printed electrode. *Biotech Bioeng* 78, pp. 110-116.
- Lin Q, Shen KL, Zhao H-M, Li W-H., 2008 - Growth response of *Zea mays* L. in pyrene-copper co-contaminated soil and the fate of pollutants. *J Hazard Mater* 150, pp. 515-521.

- Martí E., Sierra J., Sánchez M., Cruaños R., Garau M-A., 2007 - Ecotoxicological tests assessment of soils polluted by chromium (VI) or pentachlorophenol. *Sci Total Environ* 378, pp. 53-57.
- Mihoub A., Chaoui A., El Ferjani E., 2005 - Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *C R Biologies* 328, pp. 33-41.
- Mysliwa-Kurdziel B., Strzalka K., 2002 - Influence of metal on biosynthesis of photosynthetic pigments. *In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad M.N.V., Strzalka K. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2002, pp. 201-227.
- Prasad M-N, Strzalka K. 2002- Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. p. 432.
- Remon E., Bouchardon J.-L., Cornier B., Guy B., Leclerc J.-C., Faure O., 2005 - Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environ Poll* 137, pp. 316-323.
- Salt D-E., Blaylock M., Kumar P-B-A., Dushenkov V., Ensley B-D., Chet I., Raskin I., 1995 - Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Bio/Technol* 1, pp. 468-474.
- Sanders C-A., Rodriguez M., Greenbaum E., 2001 - Stand-off tissue-based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction. *Biosens Bioelectron* 16, pp. 439-46.
- Vaillant N., Monnet F., Hitmi A., Sallanon H., Coudret A., 2005 - Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59, pp. 1005-1013.
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M., 2007 - Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. *Environ Pollut* 147, pp. 50-59.
- Wenzel W-W., Bunkowski M., Puschenreiter M., Horak O., 2003 - Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ Pollut* 123, pp. 131-138.

